

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Vojtěch Šprincl

Úloha mikroRNA při poranění a regeneraci míšní tkáně

The role of miRNA in injury and regeneration of spinal cord tissue

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Natalija Romanyuk, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2020

.....

Vojtěch Šprinc

Mé poděkování patří Mgr. Nataliji Romanyuk, Ph.D. za věnovaný čas, ochotu, trpělivost a podnětné připomínky ohledně mé práce. Zároveň bych chtěl poděkovat rodině a blízkým přátelům za podporu.

Abstrakt

MikroRNA jsou malé nekódující molekuly RNA o délce zhruba 20-24 nukleotidů, které post-transkripčně regulují genovou expresi. Interferují s mRNA přes párování bází v komplementárních sekvencích. V posledních letech se ukazuje jejich významná role při poranění a regeneraci nervové tkáně. Cílem této bakalářské práce je popsat možnou úlohu miRNA při poranění centrální nervové soustavy se zaměřením na poranění míchy.

Klíčová slova: mikroRNA, miRNA, poranění nervové tkáně, poranění míšní tkáně, regenerace nervové tkáně

Abstract

MicroRNAs are small non-coding RNA molecules of a length about 20-24 nucleotides, that regulate gene expression post-transcriptionally. They interfere mRNA molecules via base-pairing with complementary sequences. Recently it was shown that they play an important role in injury and regeneration of nervous tissue. The aim of this bachelor thesis is to describe possible role of miRNAs in central nervous system injury with focus on spinal cord injury.

Key words: microRNA, miRNA, nervous tissue injury, spinal cord injury, regeneration of nervous tissue

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A20	enzym limitující průběh zánětu a apoptózy
Ago	protein součástí RISC komplexu (<u>A</u> rgonaute);
Agomir	chemicky upravená ds miRNA mimikující funkci maturované miRNA
Antagomir	chemická upravená ss miRNA inhibující funkci maturované miRNA
ATP	adenosintrifosfát (<u>a</u> denosine <u>t</u> riphosphate)
Bad	protein spouštějící apoptózu (<u>B</u> cl-2 associated <u>a</u> gonist of cell <u>d</u> eath)
Bax	protein působící při apoptóze (<u>B</u> cl-2-associated <u>X</u> protein);
Bcl-2	proteinová rodina ovlivňující buněčnou smrt (název z <u>B</u> -cell lymphoma)
BH3-only	členové rodiny Bcl-2 proteinů obsahující pouze BH-3 doménu
Bim	protein působící při apoptóze (Bcl-2-like protein 11)
BMP	růstový faktor (<u>b</u> one <u>m</u> orphogenetic protein)
C/EBP-α	transkripční faktor (<u>C</u> CAA/ <u>e</u> nhancer- <u>b</u> inding protein- <u>α</u>)
CD45	protein tyrosin fosfatáza (<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation <u>45</u>)
CDK	cyklin dependentní kináza (<u>c</u> yclin- <u>d</u> eendent <u>k</u> inase)
CREB	transkripční faktor (<u>c</u> AMP <u>r</u> eponse <u>e</u> lement- <u>b</u> inding protein)
DGCR8	podjednotka mikroprocesoru (<u>D</u> i <u>G</u> eorge syndrome <u>c</u> hromosomal region <u>8</u>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
FasR	Fas receptor (<u>F</u> as <u>r</u> eceptor)
FasL	Fas ligand (<u>F</u> as <u>l</u> igand)
FGF	fibroblastový růstový faktor (<u>f</u> ibroblast growth <u>f</u> actor)
GPx1 / GPx3	enzym přeměňující H ₂ O ₂ na H ₂ O (glutathione perox <u>i</u> dase <u>1/3</u>)
HIF-1	transkripční faktor reagující na hypoxii (<u>h</u> ypoxia- <u>i</u> nducible <u>f</u> actor <u>1</u>)
Hsc70/Hsp90	komplex chaperonů (<u>h</u> eat <u>s</u> hock <u>c</u> ognate <u>70</u> / <u>h</u> eat <u>s</u> hock protein <u>90</u>)
IGF-1	růstový faktor (<u>i</u> nsulin-like growth <u>f</u> actor- <u>1</u>)
IL-10	cytokin (<u>i</u> nter <u>l</u> eukin <u>10</u>)
IL-13	cytokin (<u>i</u> nter <u>l</u> eukin <u>13</u>)
IL-1β	cytokin (<u>i</u> nter <u>l</u> eukin <u>1β</u>)
IL-4	cytokin (<u>i</u> nter <u>l</u> eukin <u>4</u>)
IL-6	cytokin (<u>i</u> nter <u>l</u> eukin <u>6</u>)

INF-γ	cytokin (<u>inter</u> feron <u>γ</u>)
iNOS	enzym katalyzující produkci NO (<u>inducible</u> <u>NO</u> synthase)
JAK/STAT	signální dráha řídící imunitní reakci, buněčný cyklus i buněčnou smrt (<u>Janus</u> <u>kinase</u> / <u>signal</u> <u>transducer</u> and <u>activator</u> of <u>transcription</u> <u>protein</u>)
Kaspázy	proteázy hrající roli při apoptóze (<u>cysteine</u> - <u>aspartic</u> <u>proteases</u>)
Mcl-1	protein regulující apoptózu (<u>myeloid</u> <u>cell</u> <u>leukemia</u> <u>1</u>)
MHC II	transmembránové proteiny důležité pro zahájení imunitní odpovědi (<u>major</u> <u>histocompatibility</u> <u>complex</u> <u>II</u>)
miRNA	krátká molekula RNA regulující translaci mRNA (<u>micro</u> <u>RNA</u>)
mRNA	produkt RNA polymerázy (<u>messenger</u> <u>RNA</u>)
mTOR	serin/threoninová kináza (<u>mammalian</u> <u>target</u> of <u>rapamycin</u>)
NeuroD	transkripční faktor důležitý pro nervovou tkáň
NF-κB	transkripční faktor (<u>nuclear</u> <u>factor</u> <u>κ</u> -light-chain-enhancer of activated <u>B</u> cells)
Ngn1	transkripční faktor důležitý pro vývoj nervové soustavy (<u>neurogenin</u> <u>1</u>)
Noxa	pro-apoptický člen Bcl-2 rodiny
Nrg-1	buněčná adhezivní molekula důležitá pro vývoj nervové a srdeční soustavy (<u>neuregulin</u> <u>1</u>)
P21	protein blokující činnost CDK a tím zastavující buněčný cyklus
PCR	metoda pro zmnožení molekul DNA (<u>polymerase</u> <u>chain</u> <u>reaction</u>)
PDCD4	protein regulující buněčnou smrt (<u>programmed</u> <u>cell</u> <u>death</u> <u>protein</u> <u>4</u>)
PI3K/Akt	signální dráha regulující např. CREB nebo mTOR (<u>phosphoinositide</u> <u>3-</u> <u>kinase</u> / <u>protein</u> <u>kinase</u> <u>B</u> = Akt)
pre-miRNA	sestříhnutá forma pri-miRNA (<u>precursor</u> <u>miRNA</u>)
pri-miRNA	miRNA ve stavu po transkripci (<u>primary</u> <u>miRNA</u>)
PTEN	nádorový supresor (<u>phosphatase</u> and <u>tensin</u> homolog)
PU.1	transkripční faktor
Puma	pro-apoptický člen Bcl-2 rodiny
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (<u>quantitative</u> <u>real-time</u> <u>polymerase</u> <u>chain</u> <u>reaction</u>)
RB1	nádorový supresor (<u>retinoblastoma</u> <u>1</u>)
RhoA	GTPáza regulující dynamiku cytoskeletu (<u>Ras</u> <u>homoloh</u> family member <u>A</u>)
RISC	proteinový komplex vážící miRNA (<u>RNA</u> - <u>induced</u> <u>silencing</u> <u>complex</u>)
RNA	ribonukleotidová kyselina (<u>ribo</u> <u>nucleic</u> <u>acid</u>)

RNA pol II	eukaryotická polymeráza přepisující DNA do mRNA (<u>R</u> NA <u>p</u> olymerase <u>I</u> I)
RNáza III	enzym štěpící RNA
ROS scavenger	enzym/protein regulující oxidativní stres v buňce (<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies <u>s</u> cavenger)
SMAD	protein signální kaskády regulující buněčné dělení (<u>m</u> others <u>a</u> gainst <u>d</u> ecapentaglegic homolog)
STAT3	transkripční faktor (<u>s</u> ignal <u>t</u> ransducer and <u>a</u> ctivator of <u>t</u> ranscription <u>3</u>)
TGF-β	cytokin a růstový faktor (<u>t</u> ransforming growth <u>f</u> actor <u>β</u>)
Th1	prozánětlivý fenotyp T lymfocytů (<u>T</u> <u>h</u> elper cells)
TNF-α	prozánětlivý cytokin (<u>t</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor <u>α</u>)
TNFR1	receptor pro TNF-α (<u>t</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor <u>1</u>)
TXNL1	enzym regulující oxidativní stres v buňce (<u>t</u> hioredo <u>x</u> in-like protein <u>1</u>)
Ubiquitin K63	ubiquitin připojený přes lysin 63
UTR	nepřekládaná oblast DNA (<u>u</u> n <u>t</u> ranslated <u>r</u> egion)
VCAM	protein zprostředkující adhezi imunitních buněk na endotel cév (<u>v</u> ascular <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule)
VEGF	růstový faktor důležitý pro angiogenezi (<u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
Vimentin	protein středních filament

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CO JE TO miRNA?	2
2.1	Funkce miRNA.....	2
2.2	Biogeneze miRNA.....	2
3	MECHANISMY PORANĚNÍ MÍCHY	5
3.1	Sekundární mechanismus poranění míchy	5
3.1.1	Akutní a sub-akutní fáze	6
3.1.1.1	Iontová nerovnováha	6
3.1.1.2	Imunitní odpověď.....	6
3.1.1.2.1	Reakce vrozené imunity	7
3.1.1.2.2	Reakce získané imunity	7
3.1.2	Chronická fáze	8
4	miRNA A PORANĚNÍ MÍCHY	9
4.1	Porušení hematoencefalitické bariéry.....	9
4.1.1	miR-124	9
4.2	miRNA regulující imunitní odpověď	10
4.2.1	miR-136-5p.....	10
4.2.2	miR-325b-3p a miR-199b	11
4.2.3	miR-155	11
4.2.4	miR-181	11
4.2.5	miR-99a.....	11
4.2.1	miR-544a, miR-137 a miR-219-5p	12
4.2.2	miR-let-7.....	12
4.3	Infiltrace lymfocytů	12
4.4	miRNA ovlivňující buněčnou smrt a oxidativní stres	13
4.4.1	miR-20a a miR-29b.....	13
4.4.2	miR-129-5p a miR-137-3p.....	13
4.4.3	miR-124*	14
4.4.4	miR-411	14
4.4.5	miR-195	14
4.4.6	miR-486	15
4.5	Formace gliové jizvy, aneb buněčný cyklus.....	15
4.5.1	miR-21	15
4.5.2	miR-17	16

4.6	Axonální regenerace	18
4.6.1	miR-133b	18
4.6.2	miR-219	18
5	ZÁVĚR.....	19
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	21

1 ÚVOD

Poškození nervové tkáně je velmi vážné poranění s dlouhodobými následky spojené s nákladnými finančními výdeji. Podle Světové zdravotnické organizace (web WHO, 2013) přibude celosvětově jen u poranění míchy každoročně 250 až 500 tisíc nových případů (40-80 případů na milion obyvatel). Tito lidé dále v závislosti na vážnosti zranění žijí se zvýšeným rizikem předčasného úmrtí (až 2-5x pravděpodobněji, než u lidí bez poranění míchy), chronickou bolestí, či částečnou ztrátou senzorických i motorických nervů.

Dodnes však není známa žádná forma spolehlivé léčby, která by pacientům pomohla s úplným zotavením. Nejnovější výzkumy však ukazují důležitost miRNA při těchto zraněních a naznačují možnou cestu, jak skrze tyto molekuly zlepšit regeneraci tkáně. Jedná se o krátké molekuly RNA post-translačně regulující řadu proteinů, které hrají roli zejména v buněčném cyklu a buněčné smrti, imunitní odpovědi, či při vývoji organismu.

Velké množství miRNA představuje v dnešní době výzvu pro řadu vědeckých týmů zabývajících se zmapováním jejich účinku při patofyziologii poranění. Mohou však být novou nadějí pro léčbu pacientů trpících následky těchto zranění.

V této práci bych se chtěl zaměřit na miRNA hrající roli zejména při poranění míšní tkáně, a to v oblastech imunitní odpovědi, formaci gliové jizvy a regeneraci neuronů. Cílem si pokládám nastínit děje probíhající v tkáni po poranění a uceleně popsat změnu exprese důležitých miRNA s důsledky těchto změn ve formě vlivu na průběh poranění či regenerace tkáně.

2 CO JE TO miRNA?

MikroRNA jsou malé protein-nekódující molekuly RNA o délce zhruba 20-24 nukleotidů (Lagos-Quintana et al., 2001), které post-transkripčně regulují genovou expresi (Eulalio et al., 2009; Morozova et al., 2012). Byly objeveny poprvé v 90. letech u *Caenorhabditis elegans* jako produkty genů *lin-4* a *let-7*, které však nebyly dále translatovány. Tyto tzv. „small non-coding RNAs“ však obsahovaly komplementární sekvence s některými mRNA, a proto se již tehdy objevila hypotéza o jejich možné regulační funkci (R. C. Lee et al., 1993). Dnes je obecně přijímán fakt, že miRNA je důležitý regulátor mnoha buněčných pochodů u vyšších eukaryot, zejména u rostlin a obratlovců, nicméně případy miRNA lze dohledat i u jiných živočichů jako je *Drosophila melanogaster* (Bartel, 2018; Iftikhar et al., 2019; You et al., 2017).

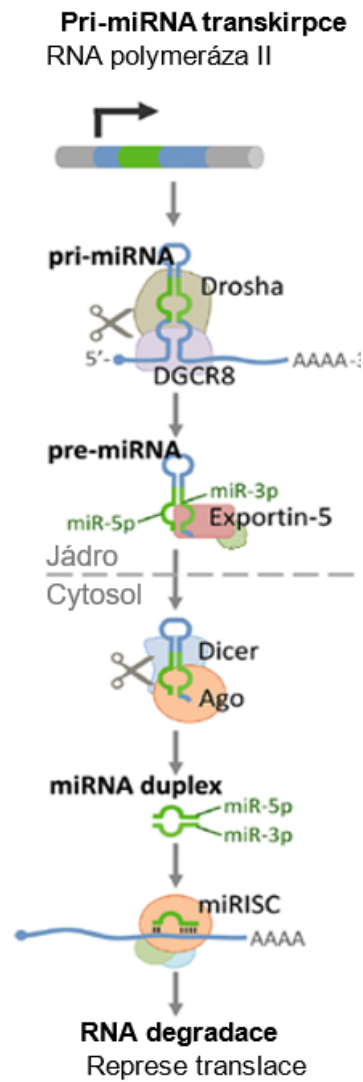
2.1 Funkce miRNA

Již výše zmíněné komplementární úseky miRNA s některými mRNA jsou nazývány jako tzv. „seed sequence“. Ty se nachází na 5' konci miRNA a jsou evolučně konzervovány (Lewis et al., 2003). Jedna tato „seed“ sekvence je často komplementární s více mRNA, kde se váže na 3' UTR, což umožňuje regulovat velké množství genů. Obvykle se jedná o funkční homology, případně o proteiny účastnící se jedné signální dráhy (Lewis et al., 2005; Lim et al., 2005; Stark et al., 2005). Účinnost této regulace, kdy se vždy jedná o represi, je však v řádu několika procent (Selbach et al., 2008). Tímto způsobem je regulována až třetina lidských genů (Lewis et al., 2005). MikroRNA se uplatňuje například při regulaci genů určující tkáňovou specifitu (Lim et al., 2005), při vývoji organismu (R. C. Lee et al., 1993), či při patofyziologických dějích (Nieto-Diaz et al., 2014).

2.2 Biogeneze miRNA

MikroRNA jsou přepisovány z genomové DNA paralelně s mRNA RNA polymerázou II ve formě až tisíce bází dlouhých molekul, které jsou nazývány primární miRNA (pri-miRNA) (Y. Lee et al., 2004; Rodriguez et al., 2004). Některé pri-miRNA mohou být v jádře editovány (Kawahara et al., 2008). Všechny pri-miRNA obsahují 5' čepičku, ale pouze některé mají poly(A) konec (Cai et al., 2004), to protože funkce RNA pol II může být někdy přerušena RNázou III, čímž znemožní syntézu poly(A) konce (Ballarino et al., 2009). Struktura pri-miRNA má v sobě vždy konvertovanou repetici, díky které vytváří vlásenku, kterou rozpoznává tzv. „microprocessor“.

Jedná se o heterotrimer tvořený jednou molekulou endonukleázy Drosha a dvou molekul strukturního proteinu DGCR8 (Nguyen et al., 2015). Mikroprocesor poté sestřihává pri-miRNA do formy prekurzorové miRNA (pre-miRNA). Jedná se o 60 nukleotidů dlouhou vlásenku. Rozdíl mezi pri-miRNA a pre-miRNA lze vidět na obrázku 1. Pre-miRNA je dále exportována pryč z jádra jaderným přenašečem Exportinem-5 (Lund & Dahlberg, 2006). V cytoplazmě je pre-miRNA zachycena další RNázou III, tzv. „Dicer“, které je podobně jako Drosha součástí proteinového komplexu (Lau et al., 2009). Dicer vytvoří již funkční mature-miRNA duplex odštěpením zbytku vlásenky, a přitom se orientuje z 5' konce (Park et al., 2011). Tento duplex je dále pomocí chaperonu Hsc70/Hsp90 (případně i za asistence Dicer (Chendrimada et al., 2005)) přenesen do RNA-induced silencing complex (RISC), konkrétně na protein Argonaut (Hammond et al., 2000; Iwasaki et al., 2010). Zde se z duplexu vybere „mature-miRNA“ vlákno a „designated miRNA“ vlákno, které je degradováno (viz obr. 1). „Mature-miRNA“ dále slouží jako „guide RNA“ pro RISC a tak reguluje genovou expresi (Hammond et al., 2000).



Obrázek 1: Schéma biogeneze miRNA, převzato z (Gaudet et al., 2018), v tomto schématu lze mimo jiné pozorovat vznik jednotlivých typů miRNA, tedy miR-5p a miR-3p, v závislosti na tom, které ze dvou vláken se stane „mature“ a které „designated“.

3 MECHANISMY PORANĚNÍ MÍCHY

Poranění míšní tkáně lze rozdělit na základě patofyziologie na primární a sekundární (Tator, 1995). Pod pojmem primární poranění, či primární mechanismus, se ukrývá fyzické poškození míchy, tedy různé typy pohmoždění, střelné poranění, či zlomený nebo dislokovaný obratel v krční oblasti – takový příklad lze pozorovat na obrázku 2. Poranění míchy lze způsobit i netraumatickou cestou jako následek infekčního onemocnění, rakoviny, či například mrtvice. Úraz způsobí na buněčné úrovni obrovské množství změn a dojde ke spuštění klíčových signálních kaskád obecně nazývané jako sekundární mechanismus (Tator, 1995).



Obrázek 2: Zlomenina a dislokace C4 obratle, komprese míchy
Převzato z https://en.wikipedia.org/wiki/Spinal_cord_injury

3.1 Sekundární mechanismus poranění míchy

Sekundární mechanismus je obecné pojmenování všech biochemických změn na buněčné úrovni, které se spouštějí v návaznosti na primární poranění. Jako takový se dá dále rozdělit na akutní (do 4. dne po úrazu), sub-akutní (5 až 14 dní po úrazu) a chronickou fázi (od 15. dne po úrazu) (Alizadeh et al., 2019).

3.1.1 Akutní a sub-akutní fáze

V důsledku poranění dochází již během pár minut k vážným změnám v nervové tkáni. Nejdříve dojde k přerušení přítoku okysličené krve v důsledku poškození hematoencefalické bariéry, čímž dojde i k snížení krevního tlaku v místě poranění, což šíří ischemickou oblast v tkáni. Nedostatek kyslíku a ATP, který může trvat až 24 hodin po primárním poranění (Rivlin & Tator, 1978), způsobuje umírání nervových buněk. Hypoxický stav vede k zvýšené koncentraci glutamátu v extracelulární matrix (Chen et al., 2007), který je rozpoznáván jak metabotropními, tak i ionotropními receptory, což vede k uvolnění Ca^{2+} do cytosolu. Dlouhodobá vysoká koncentrace vápenatých iontů aktivuje signální dráhy vedoucí k apoptóze/nekróze nervových buněk (Pivovarová & Andrews, 2010). Astrocyty dále mohou uvolňovat další glutamát v reakci na zvýšenou koncentraci vápenatých iontů, což vede k akumulaci glutamátu v poraněné tkáni po dobu jedné hodiny, na kterou reagují neurony buněčnou smrtí v důsledku excitotoxicity.

3.1.1.1 Iontová nerovnováha

Mitochondrie reagují na zvýšenou koncentraci Ca^{2+} zpomalením oxidativní fosforylace, což vede k dalšímu úbytku ATP v buňkách (Pandya et al., 2013). Bez energie nezvládá Na^+/K^+ přenašeč pumpovat sodíkové ionty ven z buňky, takže se sodík hromadí v cytosolu. Zvýšená koncentrace sodíku způsobí okyselení cytosolu v důsledku aktivace Na^+/H^+ přenašeče (Agrawal & Fehlings, 1996), což vede k oxidativnímu stresu. Kyselé prostředí totiž způsobuje vyvázání Fe^{2+} z feritinu a transferinu, který samovolně oxiduje na Fe^{3+} , a způsobuje tak tvorbu superoxidů, které dále navozují nekrózu.

3.1.1.2 Imunitní odpověď

Reakce imunitního systému na primární poranění míchy je jeden z klíčových faktorů, který zásadním způsobem ovlivňuje následný průběh regenerace či hlubší poškození tkáně. Vše záleží na konkrétním typu imunitní buňky a časovém úseku, kdy se daná buňka do poraněné oblasti dostane. Dříve se mělo za to, že imunitní odpověď, která vede k zánětu vede ke zhoršení stavu, dnes jsou ale známy mechanismy, kdy zánět v určitý okamžik naopak vede k regeneraci tkáně aktivací kmenových buněk (Stirling et al., 2009).

3.1.1.2.1 Reakce vrozené imunity

Během prvních 24 hodin migrují do místa poranění neutrofilny (Beck et al., 2010), které zprostředkovávají produkci cytokinů a určují tak další průběh zánětu. Zároveň provádějí fagocytózu a tím zmírňují poškození tkáně. Dva až tři dny po primárním poranění se dostávají do poškozené tkáně monocyty (Beck et al., 2010), které se diferencují na makrofágy, jenž společně s mikroglie přebírají roli neutrofilů jako hlavního buněčného typu provádějící fagocytózu. V závislosti na mikroprostředí, ve kterém se jednotlivé makrofágy ocitnou, se mohou polarizovat na jeden ze dvou fenotypů (Alizadeh et al., 2019).

M1 fenotyp navozený T_H1 cytokiny $INF-\gamma$ či $TNF-\alpha$ je obecně považován za prozánětlivý. Na svém povrchu produkuje MHC II receptory, pomocí kterých aktivují imunitní systém a tím pohání další průběh zánětu. M1 fenotyp má zároveň omezenou schopnost fagocytovat. Na druhou stranu fenotyp M2, který je navozený zejména vysokou koncentrací IL-10 společně s IL-13 a IL-4, více fagocytuje a produkuje řadu růstových faktorů ($TGF-\beta$, VEGF, IGF-1) (Mosser & Edwards, 2008). Obecně je M2 fenotyp považován za prospěšný pro další regeneraci tkáně, ale je potřeba zdůraznit, že příliš vysoké koncentrace růstových faktorů v akutní fázi produkované M2-makrofágy i neutrofilny (BMPs, FGFs, VEGFs) mohou vést k vytvoření jizvy, která naopak brání regeneraci (Braga et al., 2015).

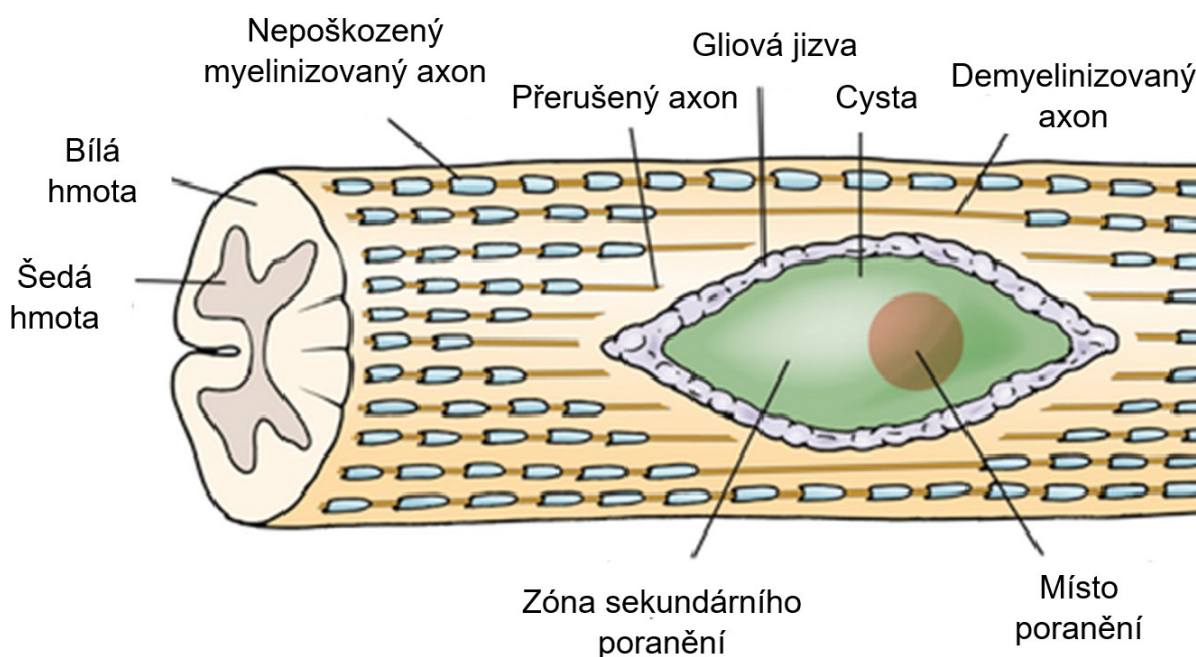
3.1.1.2.2 Reakce získané imunity

Buňky specifické imunitní odpovědi, tedy T a B lymfocyty, se do místa poranění dostávají během prvního týdne a působí zde i během chronické fáze (Beck et al., 2010). Důležitou roli při patofyziologii hrají regulační lymfocyty, které tlumí zejména autoreaktivní imunitní odpověď. Jejich aktivita je však v důsledku poranění rozrušena a nemohou tak přerušovat činnost autoreaktivních lymfocytů. T lymfocyty produkují prozánětlivé cytokiny, které vedou makrofágy do M1 fenotypu a navozují apoptózu oligodendrocytů a neuronů přes FasR. T lymfocyty mají dále schopnost aktivovat autoreaktivní B lymfocyty, které produkují autoprotilátky způsobující hlubší poškození tkáně. Specifická imunitní odpověď však může působit i protizánětlivě skrze regulační B lymfocyty produkující IL-10. Jejich funkcí je navodit diferenciaci regulačních T lymfocytů, které pak dále mohou regulovat autoreaktivní T lymfocyty, nebo jim mohou přímo navodit apoptózu (Alizadeh et al., 2019).

3.1.2 Chronická fáze

Již během prvních hodin po úrazu se kolem místa poranění začíná tvořit základní struktura gliové jizvy, která se později stává jednou z nejvýznamnějších charakteristik chronické fáze. Tato první forma jizvy je tvořena zejména aktivovanými astrocyty formující fyzickou i biochemickou bariéru, která zamezuje šíření negativních projevů poranění (iontová nerovnováha, šíření cytokinů...) a zabraňuje tak hlubšímu poškození (Bradbury & Burnside, 2019). Během prvních 14 dnů do jizvy migruje řada dalších buněk, zejména fibroblasty z meziobratlové ploténky produkující semaforiny, které ovlivňují růst axonů (Pasterkamp et al., 1999; Soderblom et al., 2013)

Hlavním důvodem, proč je gliová jizva v chronické fázi problémem, je produkce chondroitin sulfát proteoglykanů, které podporují vytváření a i udržování gliové jizvy (Cafferty et al., 2007). Na obrázku 3 lze vidět schématické znázornění místa poranění míchy a již vytvořenou gliovou jizvu, která vytváří ochrannou bariéru před šířením negativních vlivů sekundárního mechanismu zranění, stejně tak jako překážku pro růst axonů a regeneraci tkáně.



Obrázek 3: Schéma místa poranění míchy, převzato z (McDonald, 1999)

4 miRNA A PORANĚNÍ MÍCHY

Role miRNA při poranění nervové tkáně je předmětem mnoha studií, které postupně pomáhají sestavit obraz popisující jejich úlohu. Některé miRNA lze přímo propojit s konkrétními geny, které dále regulují. V řadě případů je nicméně spíše pozorována změna exprese některých genů, která koreluje se změnami hladin konkrétních miRNA, ale není stále objasněno, jakým způsobem regulace probíhá. Mezi nejdůležitější dráhy ovlivňované miRNA patří zejména produkce faktorů řídící imunitní odpověď, buněčný cyklus, s kterým souvisí formace gliové jizvy, a axonální regenerace. miRNA lze dále využívat jako markery buněčných typů, díky kterým můžeme sledovat například infiltraci imunitních buněk do poraněné tkáně.

4.1 Porušení hematoencefalitické bariéry

V důsledku fyzického poranění míšní tkáně dochází k přetrhání cév, a to je důvodem přítomnosti červených krvinek v místě zranění. Důkazem toho je zvýšená hladina miR-451 v prvních 4 až 12 hodinách po poranění (N. K. Liu et al., 2009; Nakanishi et al., 2010). Jedná se o miRNA typickou pro retikulocyty (Merkerova et al., 2008). Z krve se do dané oblasti dostávají i buňky imunitního systému, zejména neutrofily, které tvoří až 70 % složení bílých krvinek v krvi. Přítomnost neutrofilů je jeden z důvodů zvýšené hladiny miR-223 v průběhu celé akutní i sub-akutní fáze (Chung et al., 2020). Jedná se totiž o miRNA regulující diferenciaci buněk myeloidní řady (Brook et al., 2019). Lze ji tak považovat za marker přítomnosti buněk vrozené imunity. Tým Y. Guana dále poukázal na vliv miR-223-5p při polarizaci potkaních mikroglií. V jejich experimentu vedla zvýšená exprese této miRNA v k M1 fenotypu (prozánětlivá forma), zatímco inhibice miR-223-5p vedla k protizánětlivé formě M2 a zvýšené expresi faktoru Nrg-1, který inhibuje apoptózu neuronů a brání tvorbě gliové jizvy (Alizadeh et al., 2018; Guan et al., 2019).

4.1.1 miR-124

Další z důležitých miRNA regulující imunitní odpověď je miR-124. Jedná se o miRNA důležitou při diferenciaci neuronů z kmenových buněk, kdy působí na 3' UTR mRNA fosfatázy-1. Tento enzym pak svou činností brání v expresi genů typických pro neurony (Visvanathan et al., 2007). Koncentrace miR-124 je během prvních 4 hodin zvýšena, ale v průběhu dalších měření prudce klesá (N. K. Liu et al., 2009), což může přímo souviset s úbytkem neuronů v důsledku probíhající apoptózy. Tomu nasvědčují i stejné změny koncentrací další neuron-specifické miRNA – miR-128 (N. K. Liu et al., 2009; W. Zhang et al.,

2016). miR-124 je regulátor mající velké spektrum účinku. Všeobecně lze říci, že působí protizánětlivě a pomáhá s regenerací poraněné tkáně (Cui et al., 2019; Zou et al., 2014). Nicméně jeho snížená hladina umožňuje expresi C/EBP- α , který dále pozitivně reguluje PU.1. Jedná se o transkripční faktory způsobující produkci makrofág-aktivujících proteinů CD45 a MHC II (Anderson et al., 2001; Nishiyama et al., 2004). Snížená hladina miR-124 dále vede k produkci TNF- α i TNFR1, což je receptor pro TNF- α (Bristol et al., 2009; Ponomarev et al., 2011), které vedou k aktivaci makrofágů a podporují zánětlivou odpověď. TNF- α jakožto jeden z hlavních prozánětlivých cytokinů však není regulován pouze miR-124, naopak je známa řada miRNA podílející se na jeho regulaci.

4.2 miRNA regulující imunitní odpověď

Reakce imunitního systému je řízena na základě produkce daných typů cytokinů, například TNF- α , který lze považovat za klíčový cytokin podílející se na rozvíjejícím se průběhu zánětu a aktivaci imunitních buněk. Za fyziologických podmínek je jeho produkce regulována několika mechanismy, na kterých se, jak se v poslední době ukazuje, z velké části podílí miRNA. Jedná se často o miRNA tkáňově specifické, které za fyziologických podmínek zabraňují imunitní reakci v nervové soustavě. V souladu s tímto předpokladem lze pozorovat snížení hladin těchto miRNA již několik hodin po způsobeném poranění jako reakci buněk na patofyziologické prostředí apoptózou (Hutchison et al., 2013; N. K. Liu et al., 2009; Yunta et al., 2012). V kontrastu s tím je však řada miRNA, jejichž koncentrace po poranění stoupá. Jedná se o miRNA regulující protizánětlivé transkripční faktory (He et al., 2017), tedy látky, jejichž genová exprese je v neporaněné tkáni aktivní.

4.2.1 miR-136-5p

Jednou z takových miRNA je například miR-136-5p, která cílí na protein A20 (He et al., 2017). Ten reguluje vnitrobuněčné signály tím, že přestřihává ubiquitin K63 a brání tak signalizaci vedoucí k produkci transkripčního faktoru NF- κ B, který pak přímo navozuje expresi TNF- α (Ma & Malynn, 2012). Tato miRNA specifická pro astrocyty je však v potkaním modelu v průběhu akutní fáze produkována více než za fyziologických podmínek a to vede k snížení exprese A20, a tedy dále pak k produkci NF- κ B a TNF- α (He et al., 2017).

4.2.2 miR-325b-3p a miR-199b

Další z řady miRNA regulující aktivaci NF- κ B jsou miR-325b-3p a miR-199b. Tyto miRNA jsou schopny negativně regulovat kinázy, které aktivují transkripční faktor NF- κ B. Jejich hladiny jsou v důsledku poranění míšní tkáně potkanů sniženy, což se ve výsledku projevuje aktivací imunitního systému a mikroglií v reakci na zvýšenou produkci TNF- α (Yan et al., 2019; Zhou et al., 2016).

4.2.3 miR-155

Podobně jako u miR-136-5p je miR-155 miRNA, jejíž hladina se po poranění zvyšuje a která hraje roli při regulaci TNF- α . Experiment skupiny E. Tiliho prokázal, že se zvýšenou hladinou miR-155 zároveň dochází k zvýšené produkci TNF- α . Mechanismus této regulace však zůstává neobjasněn, samotný tým však polemizuje nad mechanismem, kdy by miR-155 přímo cílila na mRNA TNF- α a tím vyrušila sebe-regulující efekt 3'UTR oblasti (Tili et al., 2007).

4.2.4 miR-181

Jedná se o astrocyt specifickou miRNA, která hraje důležitou roli při regulaci buňkou produkovaných cytokinů. Snižování koncentrace miR-181 pod fyziologickou hranici vede k expresi prozánětlivých interleukinů IL-6 a IL-1 β společně s TNF- α . V kontrastu s tím však vysoké hladiny této miRNA způsobují produkci IL-10, který obecně tlumí odpověď imunitního systému. Měřené hodnoty miRNA v buněčných kulturách myších astrocytů naznačují sníženou koncentraci miR-181 při poranění míšní tkáně, což vede k produkci TNF- α (Hutchison et al., 2013).

4.2.5 miR-99a

Zajímavým příkladem regulace pomocí negativní zpětné vazby je miR-99a, která přímo reguluje mTOR/NF- κ B signální dráhu a tím zabraňuje produkci prozánětlivých cytokinů. Dále se však ukázalo, že NF- κ B se může navázat na promotor genu pro miR-99a a spustit tak jeho expresi. Zvýšené hladiny NF- κ B po poranění tedy způsobí produkci miR-99a, která tak svou činností brání šíření prozánětlivého mikroprostředí (Bao et al., 2016). Její hladiny jsou však zvýšené pouze v akutní fázi, již den po poranění je koncentrace miR-99a v potkaním modelu snižena pod fyziologickou hladinu (N. K. Liu et al., 2009).

4.2.1 miR-544a, miR-137 a miR-219-5p

U těchto dvou miRNA (miR-544a a miR-137) byla ukázána jejich schopnost negativně regulovat hladiny proteinu NeuroD4, který způsobuje zánětlivý průběh imunitní reakce a zvyšuje oxidativní stres v buňkách. Hladiny obou těchto miRNA se u myši v průběhu poranění míšní tkáně graduálně snižují a do fyziologických hodnot se vrací až zhruba po měsíci (Dai et al., 2018; L. Yang et al., 2018). To způsobuje produkci IL-1 a INF- α v akutní a sub-akutní fázi poranění. Stejně tak pozoroval i Y. Zhu s kolegy snížení hladiny miR-219-5p, která reguluje protein NeuroD2 mající podobný pro-zánětlivý účinek (Zhu et al., 2019).

4.2.2 miR-let-7

Tým J. Tanga zkoumal vliv hladin miR-let-7b na imunitní odpověď a našel spojitost mezi touto miRNA a prozánětlivými faktory IL-1 β , IL-6 a TNF- α , kdy s nízkými hladinami let-7b odpovídaly i nízké hladiny těchto cytokinů. Zároveň metoda Western blotu ukázala vyšší aktivitu PI3K/Akt signální kaskády a tím naznačila možnou souvislost mezi sníženou koncentrací miR-let7b, která by tak nemohla inhibovat PI3K/Akt dráhu a to by tak dále mělo vést ke snížení hladin cytokinů (J. Tang et al., 2019). Zvláštní na této miRNA je však fakt, že v původním experimentu N. K. Liua byly naměřeny nízké koncentrace této miRNA po poranění (N. K. Liu et al., 2009). Je tedy možné, že se jedná o nějaký ojedinělý případ, kdy patofyziologická dysregulace miRNA prospívá k regeneraci. Tato miRNA však potřebuje hlubší prozkoumání a řadu dalších experimentů.

4.3 Infiltrace lymfocytů

Buňkami produkováný faktor TNF- α zpětně způsobuje aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B (Hayden & Ghosh, 2014), který dále pozitivně reguluje genovou expresi VCAM1 (Collins et al., 1995). Několik hodin po poranění dochází ke snížení koncentrace miR-126 (Hu et al., 2013), která, jak se ukázalo, inhibuje produkci VCAM1. Nejedná se však o regulaci VCAM1 mRNA, přesný mechanismus není zatím známý (Harris et al., 2008). Přítomnost TNF- α a snížení hladiny miR-126 však vede k zvýšené expresi VCAM, které hrají klíčovou roli při migraci lymfocytů do poraněné tkáně, kde poté dlouhodobě udržují zánětlivou imunitní odpověď a udržují tak prostředí pro tvorbu gliové jizvy.

4.4 miRNA ovlivňující buněčnou smrt a oxidativní stres

Apoptóza, nekróza i jiné typy buněčné smrti jsou velmi pevně spjaté se zánětlivou imunitní odpovědí. Buňky mohou tímto způsobem reagovat na přítomnost cytokinů, případně mohou dostávat přímý signál od leukocytů k buněčné smrti. Mimo výše uvedené faktory hrají klíčovou roli proteiny Bcl-2 rodiny, kaspázy, které svou činností rozhodují o osudu buňky, a ROS částice.

4.4.1 miR-20a a miR-29b

X. J. Liu s kolegy se zabýval účinkem miR-20a a miR-29b na expresi genů Bcl-2 proteinové rodiny ovlivňující buněčnou smrt. Pomocí real-time PCR zjistili, že u myši dochází po poranění míchy k snížení hladiny miR-29b a naopak k zvýšení produkce miR-20a. Dále sledovali jejich účinek pomocí změny exprese kaspázy-3 a pak řadou experimentů určili proteiny, které jsou ovlivněny těmito miRNA. miR-29b reguluje pro-apoptické geny, konkrétně tzv. „BH3-only“ geny, tedy Bad, Bim, Noxa či Puma. Naopak miR-20a represuje protektivní Mcl-1. „Rescue experimenty“ obou těchto miRNA (použili obě zároveň) navíc vedou k úplnému zastavení produkce kaspázy-3, což dále naznačuje jejich stěžejní roli při buněčné smrti nervových buněk po poranění míchy (X. J. Liu et al., 2015).

Dřívější experiment dále ukázal roli miR-20a při regulaci neuroprotektivního genu Ngn1, kdy blokáce této miRNA vedla k lepšímu přežití nervových buněk a k neurogenезi (Jee, Jung, Im, et al., 2012).

4.4.2 miR-129-5p a miR-137-3p

Další z miRNA, jejichž účinek je spojován s regulací buněčné smrti, byla na potkanech studována skupinou R. Yanga. Ti pozorovali sníženou expresi miR-129-5p po poranění míchy a s tím korelující zvýšenou expresi kaspázy-3 společně s proteiny calpain-1 a calpain-2. Přesná role těchto vápníkem ovládaných enzymů není známa, avšak s největší pravděpodobností regulují průběh apoptózy (R. Yang et al., 2019). Zvýšenou hladinu calpain-2 pozoroval i tým Y. Tanga, který zkoumal miR-137-3p, u níž přímo identifikoval 3' UTR oblast na calpain-2 mRNA. Nadměrná produkce miR-129-5p a miR-139-3p vedly k snížení ztráty míšní tkáně (motoneuronů) a k celkovému zlepšení funkčního zotavení (Y. Tang et al., 2018).

4.4.3 miR-124*

Již výše zmiňovaná miR-124 spojovaná s regulací imunitní odpovědi se nově ukazuje jako zajímavý regulátor buněčné smrti. Xu s kolegy zjistili, že zvýšená hladina této miRNA vede k zmenšení poškozené oblasti a ke zlepšení motorických funkcí, proto se dále zaměřili na její konkrétní roli při buněčné smrti. Ukázali, že miR-124 se přímo váže na 3' UTR oblast mRNA proteinu Bax, který hraje klíčovou roli při apoptóze, například umožňuje uvolnění cytochromu C z mitochondrií (M. Zhang et al., 2017). Přidáním agomir-124 se snížily hladiny Bax proteinu i naštípané kaspázy-9 a kaspázy-3, naopak přidáním antagomiru-124 došlo ke zvýšení hladin proti-apoptických Bcl-2 a nenaštípaných (neaktivních) kaspáz (Xu et al., 2019)

Tato miRNA je po poranění míchy v nízkých koncentracích (N. K. Liu et al., 2009), ovšem zvýšení její hladiny se zdá být prospěšné pro regeneraci poškozené tkáně nejen z pohledu přežití nervových buněk, ale i z pohledu regulace zánětlivé odpovědi imunitního systému. Právě proto představuje jednu z nadějných miRNA, které by se daly dále terapeuticky využívat.

4.4.4 miR-411

Apoptóza není zdaleka způsobována pouze hladinami proteinů Bcl-2 rodiny. Příkladem navození apoptózy jinou cestou může být například pomocí FasL přes lymfocyty. I tuto cestu, jak se ukazuje, ovlivňují miRNA, konkrétně miR-411. Ta negativně reguluje expresi FasL, a tak zabraňuje ztrátě nervových buněk při akutní fázi zranění. V průběhu poranění je však miR-411 ve snížených koncentracích (Gong et al., 2018).

4.4.5 miR-195

Při hypoxickém stavu dochází k tvorbě tzv. „hypoxia-induced factor 1“ (HIF-1). Jedná se o heterodimer tvořený podjednotkami β (produkovaný neustále) a α (produkovaný v reakci na nedostatek kyslíku) (B. H. Jiang et al., 1996). HIF-1 pak negativně reguluje expresi VEGF a Bcl-2 s Bax proteiny, tím pádem lze účinky HIF-1 považovat za proti-apoptické (Carmeliet et al., 1998). Tým Taoa a Shia zjistil, že miR-195 reguluje expresi HIF-1 α podjednotky, a tak ovlivňuje i buněčnou smrt. Co je však až dokonce zvláštní je skutečnost, že po poranění míchy je u potkanů tato miRNA v nižších koncentracích. Díky tomu dochází k lepšímu průběhu poranění. Zvýšená hladina Bax proteinu byla v tomto experimentu spojována se zvýšenou hladinou miR-195 (Tao & Shi, 2016).

4.4.6 miR-486

Již v předchozí části jsem se zabýval miRNA regulující NeuroD proteiny (4.2.5), ty však hrály negativní roli při aktivaci imunitního systému. V kontrastu na to se Jee s kolegy zaměřil na protein NeuroD6 a miR-486, která se v pokusech ukázala jako důležitá pro jeho regulaci. Skupina sledovala zvýšenou expresi miR-486 v myším modelu po zranění míšní tkáně a s tím související sníženou hladinu NeuroD6, které přikládali neuroprotektivní úlohu. Řadou experimentů ukázali, že protein NeuroD6 pozitivně reguluje expresi „ROS scavenger“ enzymů, konkrétně GPx1, GPx3 a TXNL1. Jedná se tedy o důležitou miRNA, jejíž zvýšená hladina způsobuje oxidativní stres v buňkách (Jee, Jung, Choi, et al., 2012).

4.5 Formace gliové jizvy, aneb buněčný cyklus

Gliová jizva je jednou z charakteristik chronické fáze poranění. Vzniká jako produkt dějů probíhajících v akutní fázi, kdy například na zvýšené množství produkovaných cytokinů reagují fibroblasty migrací do tkáně a produkcí růstových faktorů, které způsobují proliferaci astrocytů. Ty společně s fibroblasty vytvářejí ochrannou bariéru bránící šíření negativních vlivů v akutní fázi. Tato bariéra však přetrvává až do chronické fáze, kde fyzicky zabraňuje axonální regeneraci neuronů a jejich myelinizaci. Navzdory tomu však není prováděno příliš velké množství experimentů zabývajících se touto problematikou, i když by se mohlo jednat o oblast se slibnými výsledky (Nieto-Diaz et al., 2014).

4.5.1 miR-21

Významnou miRNA podílející se na tvorbě gliové jizvy je miR-21. V kontrastu s miRNA popsány v předchozích kapitolách je miR-21 po poranění ve zvýšených koncentracích (Hu et al., 2013) a tlumí tak pochody negativně ovlivňující regeneraci tkáně. Geny, které tato miRNA reguluje, jsou často spjaté s apoptózou a buněčným cyklem, její přítomnost je mnohdy spojována s rakovinným bujením (Báez-Vega et al., 2016; L. P. Jiang et al., 2017).

Skupina J. Hua ve svém experimentu zjistila, že zvýšená hladina miR-21 vede u potkaních neuronů k snížení produkce FasL, a tím je brání před Fas-aktivovanou apoptózou. Dále ukázala, že miR-21 ovlivňuje gen PTEN, nádorový supresor. To vedlo k růstu nepoškozených axonů, a tedy k regeneraci poškozené tkáně. Ve svém článku navíc autoři předpokládali, že by miR-21 neměla mít žádný vliv na PDGF4/Caspase-3 signální dráhu, nicméně v roce 2019 poukázal tým T. Zhanga na možnou regulaci této dráhy. Zároveň však přiznává možnost náhody, protože

miR-21 zdaleka nereguluje jen tyto geny a je možné, že snížená hladina PDCD4 mohla být způsobena jinou, neměřenou miRNA. Obě skupiny se však shodují na protektivní funkci této miRNA (Hu et al., 2013; T. Zhang et al., 2019).

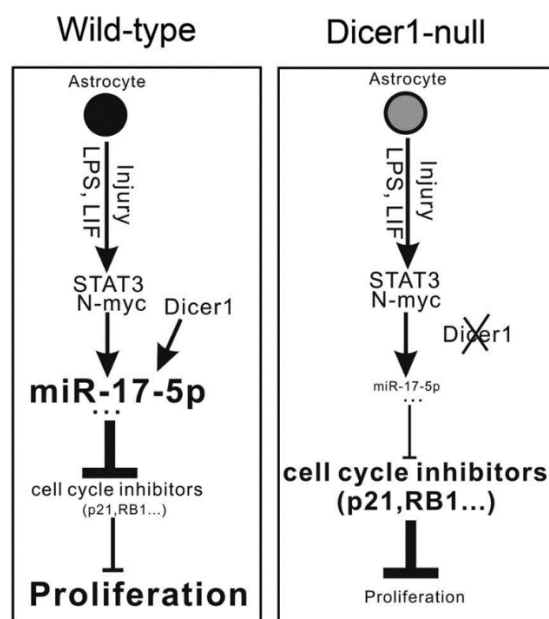
Naopak experimenty S. Ninga (opět na potkanech) poukazují na možnou roli miR-21 při aktivaci imunitní odpovědi. V jejich pokusech byla zvýšená hladina miR-21 v mikrogliích spojována se zvýšenou produkcí iNOS a TNF- α . Zároveň byla pozorována zvýšená produkce IL-6 receptoru, který v reakci na IL-6 spouští prozánětlivou odpověď skrze JAK/STAT signální dráhu (Gadient & Otten, 1997; Ning et al., 2019).

Zatímco v akutní fázi hraje miR-21 protektivní roli při apoptóze neuronů a regeneraci axonů, případně způsobuje aktivaci mikroglií, experiment R. Liua poukazuje na roli miR-21 jako regulátora tvorby gliové jizvy v chronické fázi. Tato skupina navrhuje mechanismus produkce miR-21 skrze SMAD signální dráhu aktivovanou cytokinem TGF- β 1 produkovaným fibroblasty. Pozitivní efekt inhibice PTEN v akutní fázi však vede v chronickém období poranění k aktivaci astrocytů a formaci gliové jizvy, která fyzicky brání axonální regeneraci (R. Liu et al., 2018).

Tato miRNA je zajímavým příkladem jevu, který je s těmito regulátory genové exprese pevně spjat, a to možností různého účinku v závislosti na buněčném typu produkující daný oligonukleotid společně s časovým úsekem, kdy jsou tyto ribonukleové kyseliny tvořeny.

4.5.2 miR-17

Důležitou miRNA, jejíž patologická změna exprese vede k navození formace gliové jizvy, je miR-17. Hong s kolegy se na ni ve svých experimentech (schématicky znázorněny na obrázku 4) zaměřil a zjistil možnou spojitost miR-17-5p s hladinami cyklinů, CDK a zejména s expresí regulátory buněčného cyklu RB1 a p21. Hladina miR-17-5p se zdá býti regulována JAK/STAT signální drahou, která se obecně považuje za dráhu ovlivňující buněčný cyklus a tím podporuje průběh astrogliózy (Na et al., 2007). Po poranění míchy je tato miRNA ve vyšších koncentracích, což způsobuje snížené hladiny RB1 a p21, které za fyziologického stavu zabraňují proliferaci. V důsledku toho však dochází k rozjetí buněčného cyklu vedoucí k formaci gliové jizvy (Hong et al., 2014).



Obrázek 4: Schéma regulace miR-17-5p, převzato z (Hong et al., 2014). V levé části schématu je znázorněna situace po poranění míchy, kdy v důsledku poranění dochází k aktivaci STAT3 signální dráhy, která způsobuje expresi miR-17-5p. Ta dále zabraňuje translaci inhibitoru buněčného cyklu (RB1, p21), a to způsobuje proliferaci astrocytů. V pravé části je znázorněna druhá část experimentu, kdy došlo k částečné deleci Dicer1 (úplná delece je letální), který hraje roli při biogenezi miR-17-5p. To vedlo k snížení hladiny této miRNA. Výsledek této delece vedl k zabránění proliferaci astrocytů.

Negativní vliv miR-17-5p v chronické fázi však nemusí být tak jednoznačný. Tým Y. Luana se zabýval miR-17-5p, pozorovali podobné výsledky u gliové jizvy, jako například sníženou hladinu PTEN vedoucí k spuštění PI3K/Akt/mTOR signální kaskády způsobující proliferaci. Naměřili ale zároveň i zvýšené hladiny GFAP a vimentinu, které hrají roli při skládání intermediálních filament. Ty jsou klíčové pro regeneraci axonů neuronů, kterou skutečně v experimentu zaznamenali. Oproti kontrole byly axony delší a rovnější (Luan et al., 2017).

4.6 Axonální regenerace

4.6.1 miR-133b

Jedna z mála miRNA uplatňující se při regeneraci nervových dendritů je miR-133b, jejíž snížená hladina po poranění míchy způsobuje zpomalení hojení. Experiment skupiny T. Theise ukázal, že dodáním miR-133b do poškozené myši tkáně lze docílit až 2,5x lepšího růstu axonů. Zároveň se zabývali mechanismem, který by měl tento výsledek způsobit. Zjistili, že miR-133b ovlivňuje expresi proteinu RhoA, který by měl mít negativní vliv na regeneraci (Theis et al., 2017).

Později tým D. Lia potvrdil pozorování předchozího experimentu na potkaním modelu (delší axony a více maturovaných neuronů oproti kontrole), nicméně se nezaměřili na RhoA, ale na hladiny transkripčních faktorů CREB a STAT3, které negativně ovlivňují regeneraci dendritů (pravděpodobně způsobí astrogliózu blokující růst dendritů). Jejich hladiny byly po podání miR-133b ve formě exosomů sníženy (D. Li et al., 2018).

4.6.2 miR-219

Regenerace axonu však neznamená pouze růst dendritů, naopak stejně tak důležitou částí je remyelinizace. F. Li se s kolegy zabýval vlivem miR-219 na regeneraci oligodendrocytů po poranění míchy. Pomocí qRT-PCR zjistili, že je tato miRNA po poranění ve snížených koncentracích. Když tedy poté zvýšili produkci miR-219, došlo k zvýšení počtu oligodendrocytů a snížení jejich prekurzorů. To vedlo k vyšší produkci myelinu a zlepšení motorických reflexů u myši (F. Li et al., 2019).

Společně s tím vyšel článek skupiny U. Milbrey zabývající se vlivem miR-219/miR-338 na regeneraci axonu. Ti pozorovali podobné výsledky jako předchozí skupina a zároveň potvrdili, že tyto dvě miRNA nemají vliv na astrogliózu či samotný růst nervových dendritů, tedy pravděpodobně neregulují geny růstových faktorů, či proteiny řídící buněčný cyklus. Může se tak jednat o ideální kandidáty miRNA pro klinické využití v praxi (Milbreta et al., 2019).

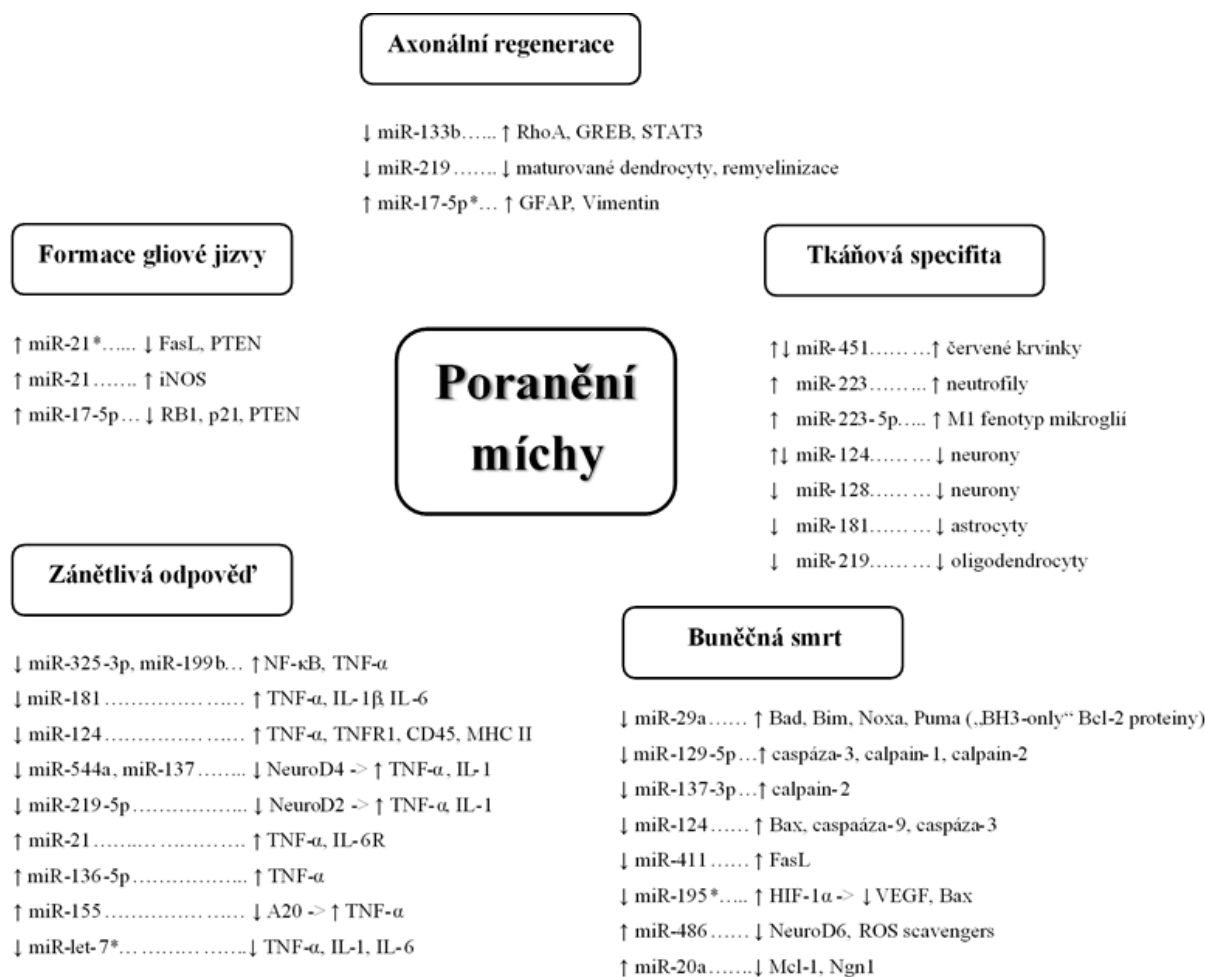
5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se zaměřil na roli několika miRNA při poranění míšní tkáně a zejména na nejnovější experimenty v této oblasti. Velké množství těchto molekul však představovalo obrovské množství neutříděných informací, které jsem se pokusil seřadit do několika oddílů. Schématické shrnutí této bakalářské práce jsem se pokusil zobrazit na obrázku 5 na předchozí straně.

Studium miRNA představuje výzvu pro výzkumné týmy skrze velkou rozmanitost těchto molekul, společně s mechanismy, kterými miRNA působí při patofyziologii poranění míchy. Nespočetné množství experimentů již v minulých letech ukázalo stěžejní roli miRNA při buněčných pochodech, a nyní je důležité se zaměřit na detailnější pohled na tyto regulace, a dále přehledněji zmapovat možné oblasti uplatnění.

Překážkou ve výzkumech se však ukazují velké oblasti účinku, které se zprvu zdály být výhodou. Společně s tím souvisí i obrovské množství jednotlivých miRNA, které ovlivňují jeden a ten samý děj. Je tedy možné, ba pravděpodobné, že během experimentu se podílí na fenotypu mnoho neměřených miRNA, podléhajících stejným regulačním mechanismům. Tedy možnost, že například po aktivaci imunitních buněk lze pozorovat zvýšenou hladinu specifické miRNA a i zvýšenou hladinu TNF- α . To ale nemusí znamenat, že tato miRNA přímo způsobuje daný vzestup koncentrací cytokinu. Proto je důležité sledovat nejenom hladiny jednotlivých miRNA, ale zároveň s tím provádět i validaci těchto miRNA na proteinové úrovni.

Právě to může představovat současnou cestu, již se některé experimentální skupiny mohou vydat. Důležité je však nadále pokračovat v základním výzkumu a vytipovat možné kandidáty miRNA na využití v klinické praxi.



Obrázek 5: Schéma miRNA a jejich vlivu při poranění míchy, vytvořené podle předlohy z (Nieto-Díaz et al., 2014). Schéma shrnuje změny hladin některých miRNA po poranění míchy a validaci těchto změn na proteinech. Šipky směrem nahoru značí zvýšené hladiny miRNA, šipky dolů snížené. Pokud má některá miRNA před sebou více šipek, jedná se o změnu v průběhu měření, kdy v akutní fázi byly naměřené vyšší hodnoty, zatímco v pozdějších měřeních se jejich hladiny snížily. Šipky před proteiny značí jejich změnu po poranění oproti fyziologickému stavu v důsledku působení odpovídající miRNA. Pokud má za sebou miRNA* (např. miR-21*), znamená to, že patofyziologická změna hladiny této miRNA vede k regeneraci tkáně.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

V tomto seznamu se před některými zdroji literatury objevuje „*“, ta označuje sekundární citace.

* Spinal cord injury. WHO | World Health Organization [online]. Copyright © [cit. 20.07.2020]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>

Spinal Cord injury. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Spinal_cord_injury

Agrawal, S. K., & Fehlings, M. G. (1996). Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: Role of Na⁺, Na⁺-K⁺-ATPase, the Na⁺-H⁺ exchanger, and the Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Journal of Neuroscience*, 16(2), 545–552. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-02-00545.1996>

* Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019). Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in Neurology*, 10(March), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00282>

Alizadeh, A., Santhosh, K. T., Kataria, H., Gounni, A. S., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2018). Neuregulin-1 elicits a regulatory immune response following traumatic spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1093-9>

Anderson, K. L., Nelson, S. L., Perkin, H. B., Smith, K. A., Klemsz, M. J., & Torbett, B. E. (2001). PU.1 is a lineage-specific regulator of tyrosine phosphatase CD45. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7637–7642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009133200>

Báez-Vega, P. M., Vargas, I. M. E., Valiyeva, F., Rosado, J. E., Roman, A., Flores, J., Marcos-Martínez, M. J., & Vivas-Mejía, P. E. (2016). Targeting miR-21-3p inhibits proliferation and invasion of ovarian cancer cells. *Oncotarget*, 7(24), 36321–36337. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9216>

Ballarino, M., Pagano, F., Girardi, E., Morlando, M., Cacchiarelli, D., Marchioni, M., Proudfoot, N. J., & Bozzoni, I. (2009). Coupled RNA Processing and Transcription of Intergenic Primary MicroRNAs. *Molecular and Cellular Biology*, 29(20), 5632–5638. <https://doi.org/10.1128/mcb.00664-09>

- Bao, M. H., Li, J. M., Luo, H. Q., Tang, L., Lv, Q. L., Li, G. Y., & Zhou, H. H. (2016). NF- κ B-regulated MIR-99a modulates endothelial cell inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5308170>
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Beck, K. D., Nguyen, H. X., Galvan, M. D., Salazar, D. L., Woodruff, T. M., & Anderson, A. J. (2010). Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: Evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain*, 133(2), 433–447. <https://doi.org/10.1093/brain/awp322>
- * Bradbury, E. J., & Burnside, E. R. (2019). Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. *Nature Communications*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11707-7>
- * Braga, T. T., Agudelo, J. S. H., & Camara, N. O. S. (2015). Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe. *Frontiers in Immunology*, 6(NOV), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00602>
- Bristol, J. A., Morrison, T. E., & Kenney, S. C. (2009). CCAAT/enhancer binding proteins α and β regulate the tumor necrosis factor receptor 1 gene promoter. *Molecular Immunology*, 46(13), 2706–2713. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.05.024>
- Brook, A. C., Jenkins, R. H., Clayton, A., Kift-Morgan, A., Raby, A. C., Shephard, A. P., Mariotti, B., Cuff, S. M., Bazzoni, F., Bowen, T., Fraser, D. J., & Eberl, M. (2019). Neutrophil-derived miR-223 as local biomarker of bacterial peritonitis. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46585-y>
- Cafferty, W. B. J., Yang, S. H., Duffy, P. J., Li, S., & Strittmatter, S. M. (2007). Functional axonal regeneration through astrocytic scar genetically modified to digest chondroitin sulfate proteoglycans. *Journal of Neuroscience*, 27(9), 2176–2185. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5176-06.2007>
- Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*, 10(12), 1957–1966. <https://doi.org/10.1261/rna.7135204>
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons,

- L., Jain, R. K., Collen, D., & Keshert, E. (1998). Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 394(6692), 485–490. <https://doi.org/10.1038/28867>
- Chen, M., Tao, Y. X., & Gu, J. G. (2007). Inward currents induced by ischemia in rat spinal cord dorsal horn neurons. *Molecular Pain*, 3, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-3-10>
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051), 740–744. <https://doi.org/10.1038/nature03868>
- Chung, H., Chung, W., Do, S., Lee, J., & Kim, H. (2020). Up-regulation of MicroRNAs-21 and -223 in a Sprague-Dawley Rat Model of Traumatic Spinal Cord Injury. *Brain Sciences*, 10(141). <https://doi.org/10.3390/brainsci10030141>
- Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D., & Maniatis, T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(10), 899–909.
- Cui, Y., Yin, Y., Xiao, Z., Zhao, Y., Chen, B., Yang, B., Xu, B., Song, H., Zou, Y., Ma, X., & Dai, J. (2019). LncRNA Neat1 mediates miR-124-induced activation of Wnt/ β -catenin signaling in spinal cord neural progenitor cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1487-3>
- Dai, J., Xu, L. J., Han, G. D., Sun, H. L., Zhu, G. T., Jiang, H. T., Yu, G. Y., & Tang, X. M. (2018). MiR-137 attenuates spinal cord injury by modulating NEUROD4 through reducing inflammation and oxidative stress. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(7), 1884–1890. <https://doi.org/10.26355/eurrev-201804-14709>
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., & Izaurralde, E. (2009). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *Rna*, 15(1), 21–32. <https://doi.org/10.1261/rna.1399509>
- Gadient, R. A., & Otten, U. H. (1997). Interleukin-6 (IL-6) - A molecule with both beneficial and destructive potentials. *Progress in Neurobiology*, 52(5), 379–390.

[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00021-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00021-X)

- Gaudet, A. D., Fonken, L. K., Watkins, L. R., Nelson, R. J., & Popovich, P. G. (2018). MicroRNAs: Roles in Regulating Neuroinflammation. *Neuroscientist*, 24(3), 221–245. <https://doi.org/10.1177/1073858417721150>
- Gong, Z., Tang, Z., & Sun, X. (2018). miR-411 suppresses acute spinal cord injury via downregulation of Fas ligand in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 501(2), 501–506. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.022>
- Guan, Y. Z., Sun, C., Wang, H. L., Xia, X. L., Lu, F. Z., Song, J., Ma, X. S., & Jiang, J. Y. (2019). MiR-223-5p inhibitor suppresses microglia inflammation and promotes Nrg-1 in rats of spinal cord injury. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(22), 9746–9753. https://doi.org/10.26355/eurev_201911_19537
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775), 293–296. <https://doi.org/10.1038/35005107>
- Harris, T. A., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Mendell, J. T., & Lowenstein, C. J. (2008). MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), 1516–1521. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707493105>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2014). Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*, 26(3), 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.05.004>
- He, J., Zhao, J., Peng, X., Shi, X., Zong, S., & Zeng, G. (2017). Molecular Mechanism of miR-136-5p Targeting NF- κ B/A20 in the IL-17-Mediated Inflammatory Response after Spinal Cord Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(3), 1224–1241. <https://doi.org/10.1159/000485452>
- Hong, P., Jiang, M., & Li, H. (2014). Functional requirement of dicer1 and miR-17-5p in reactive astrocyte proliferation after spinal cord injury in the mouse. *Glia*, 62(12), 2044–2060. <https://doi.org/10.1002/glia.22725>
- Hu, J.-Z., Huang, J.-H., Zeng, L., Wang, G., Cao, M., & Lu, H.-B. (2013). Anti-apoptotic effect of MicroRNA-21 after contusion spinal cord injury in rats. *Journal of Neurotrauma*, 30(15), 1349–1360. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2748>

- Hutchison, E. R., Kawamoto, E. M., Taub, D. D., Lal, A., Zhang, Y., Iii, W. H. W., Lehrmann, E., Becker, K. G., Gorospe, M., & Mattson, M. P. (2013). Involvement of miR-181 in Neuroinflammatory Responses of Astrocytes. *Glia*, 61(7), 1018–1028. <https://doi.org/10.1002/glia.22483>.Involvement
- Iftikhar, H., Johnson, N. L., Marlatt, M. L., & Carney, G. E. (2019). The role of miRNAs in *Drosophila melanogaster* male courtship behavior. *Genetics*, 211(3), 925–942. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301901>
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., & Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular Cell*, 39(2), 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.015>
- Jee, M. K., Jung, J. S., Choi, J. I., Jang, J. A., Kang, K. S., Im, Y. Bin, & Kyung Kang, S. (2012). MicroRNA 486 is a potentially novel target for the treatment of spinal cord injury. *Brain*, 135(4), 1237–1252. <https://doi.org/10.1093/brain/aws047>
- Jee, M. K., Jung, J. S., Im, Y. Bin, Jung, S. J., & Kang, S. K. (2012). Silencing of miR20a is crucial for ngn1-mediated neuroprotection in injured spinal cord. *Human Gene Therapy*, 23(5), 508–520. <https://doi.org/10.1089/hum.2011.121>
- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., & Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia- inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 17771–17778. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17771>
- Jiang, L. P., He, C. Y., & Zhu, Z. T. (2017). Role of microRNA-21 in radiosensitivity in non-small cell lung cancer cells by targeting PDCD4 gene. *Oncotarget*, 8(14), 23675–23689. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15644>
- Kawahara, Y., Megraw, M., Kreider, E., Iizasa, H., Valente, L., Hatzigeorgiou, A. G., & Nishikura, K. (2008). Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Research*, 36(16), 5270–5280. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn479>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), 853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>
- Lau, P.-W., Potter, C. S., Carragher, B., & MacRae, I. J. (2009). Structure of the Human Dicer-

- TRBP Complex by Electron Microscopy. *Structure*, 17(10), 1326–1332. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.013>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843–854.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>
- Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, 115(7), 787–798. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01018-3)
- Li, D., Zhang, P., Yao, X., Li, H., Shen, H., Li, X., Wu, J., & Lu, X. (2018). Exosomes derived from miR-133b-modified mesenchymal stem cells promote recovery after spinal cord injury. *Frontiers in Neuroscience*, 12(NOV), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00845>
- Li, F., Zhou, M. W., Liu, N., Yang, Y. Y., Xing, H. Y., Lu, Y., & Liu, X. X. (2019). MicroRNA-219 Inhibits Proliferation and Induces Differentiation of Oligodendrocyte Precursor Cells after Contusion Spinal Cord Injury in Rats. *Neural Plasticity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9610687>
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., & Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027), 769–773. <https://doi.org/10.1038/nature03315>
- Liu, N. K., Wang, X. F., Lu, Q. B., & Xu, X. M. (2009). Altered microRNA expression following traumatic spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 219(2), 424–429. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.06.015>
- Liu, R., Wang, W., Wang, S., Xie, W., Li, H., & Ning, B. (2018). microRNA-21 regulates astrocytic reaction post-acute phase of spinal cord injury through modulating TGF- β

- signaling. *Aging*, 10(6), 1474–1488. <https://doi.org/10.18632/aging.101484>
- Liu, X. J., Zheng, X. P., Zhang, R., Guo, Y. L., & Wang, J. H. (2015). Combinatorial effects of miR-20a and miR-29b on neuronal apoptosis induced by spinal cord injury. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(4), 3811–3818.
- Luan, Y., Chen, M., & Zhou, L. (2017). MiR-17 targets PTEN and facilitates glial scar formation after spinal cord injuries via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Brain Research Bulletin*, 128, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.09.017>
- Lund, E., & Dahlberg, J. E. (2006). Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 71, 59–66. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.050>
- Ma, A., & Malynn, B. A. (2012). A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nature Reviews Immunology*, 12(11), 774–785. <https://doi.org/10.1038/nri3313>
- McDonald, J. W. (1999). Repairing the damaged spinal cord. *Scientific American*, 281(3), 64–73. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0999-64>
- Merkerova, M., Belickova, M., & Bruchova, H. (2008). Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *European Journal of Haematology*, 81(4), 304–310. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2008.01111.x>
- Milbreta, U., Lin, J., Pinese, C., Ong, W., Chin, J. S., Shirahama, H., Mi, R., Williams, A., Bechler, M. E., Wang, J., French-Constant, C., Hoke, A., & Chew, S. Y. (2019). Scaffold-Mediated Sustained, Non-viral Delivery of miR-219/miR-338 Promotes CNS Remyelination. *Molecular Therapy*, 27(2), 411–423. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.11.016>
- Morozova, N., Zinovyev, A., Nonne, N., Pritchard, L. L., Gorban, A. N., & Harel-Bellan, A. (2012). Kinetic signatures of microRNA modes of action. *Rna*, 18(9), 1635–1655. <https://doi.org/10.1261/rna.032284.112>
- * Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Na, Y.-J., Jin, J.-K., Kim, J.-I., Choi, E.-K., Carp, R. I., & Kim, Y.-S. (2007). JAK-STAT signaling pathway mediates astrogliosis in brains of scrapie-infected mice. *Journal of*

- Neurochemistry*, 103(2), 637–649. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04769.x>
- Nakanishi, K., Nakasa, T., Tanaka, N., Ishikawa, M., Yamada, K., Yamasaki, K., Kamei, N., Izumi, B., Adachi, N., Miyaki, S., Asahara, H., & Ochi, M. (2010). Responses of microRNAs 124a and 223 following spinal cord injury in mice. *Spinal Cord*, 48(3), 192–196. <https://doi.org/10.1038/sc.2009.89>
- Nguyen, T. A., Jo, M. H., Choi, Y. G., Park, J., Kwon, S. C., Hohng, S., Kim, V. N., & Woo, J. S. (2015). Functional anatomy of the human microprocessor. *Cell*, 161(6), 1374–1387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.010>
- * Nieto-Diaz, M., Esteban, F. J., Reigada, D., Muñoz-Galdeano, T., Yunta, M., Caballero-López, M., Navarro-Ruiz, R., del Águila, Á., & Maza, R. M. (2014). MicroRNA dysregulation in spinal cord injury: Causes, consequences, and therapeutics. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00053>
- Ning, S. L., Zhu, H., Shao, J., Liu, Y. C., Lan, J., & Miao, J. (2019). MiR-21 inhibitor improves locomotor function recovery by inhibiting IL-6R/JAK-STAT pathway-mediated inflammation after spinal cord injury in model of rat. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(2), 433–440. https://doi.org/10.26355/eurev_201901_16852
- Nishiyama, C., Nishiyama, M., Ito, T., Masaki, S., Masuoka, N., Yamane, H., Kitamura, T., Ogawa, H., & Okumura, K. (2004). Functional analysis of PU.1 domains in monocyte-specific gene regulation. *FEBS Letters*, 561(1–3), 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00116-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00116-4)
- Pandya, J. D., Nukala, V. N., & Sullivan, P. G. (2013). Concentration dependent effect of calcium on brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress parameters. *Frontiers in Neuroenergetics*, 5(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnene.2013.00010>
- Park, J.-E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D. K., Chang, H., Jee, D., Patel, D. J., & Kim, V. N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, 475(7355), 201–205. <https://doi.org/10.1038/nature10198>
- * Pasterkamp, R. J., Giger, R. J., Ruitenberg, M.-J., Holtmaat, A. J. G. D., De Wit, J., De Winter, F., & Verhaagen, J. (1999). Expression of the Gene Encoding the Chemorepellent Semaphorin III Is Induced in the Fibroblast Component of Neural Scar Tissue Formed Following Injuries of Adult But Not Neonatal CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience*,

13(2), 143–166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0738>

- * Pivovarova, N. B., & Andrews, S. B. (2010). Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons: Minireview. *FEBS Journal*, 277(18), 3622–3636. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07754.x>
- Ponomarev, E. D., Veremeyko, T., Barteneva, N., Krichevsky, A. M., & Weiner, H. L. (2011). MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway. *Nature Medicine*, 17(1), 64–70. <https://doi.org/10.1038/nm.2266>
- Rivlin, A. S., & Tator, C. H. (1978). Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. *Journal of Neurosurgery*, 49(6), 844–853. <https://doi.org/10.3171/jns.1978.49.6.0844>
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, 14(10 A), 1902–1910. <https://doi.org/10.1101/gr.2722704>
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), 58–63. <https://doi.org/10.1038/nature07228>
- Soderblom, C., Luo, X., Blumenthal, E., Bray, E., Lyapichev, K., Ramos, J., Krishnan, V., Lai-Hsu, C., Park, K. K., Tsoulfas, P., & Lee, J. K. (2013). Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 33(34), 13882–13887. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2524-13.2013>
- Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell*, 123(6), 1133–1146. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.023>
- Stirling, D. P., Liu, S., Kubes, P., & Yong, V. W. (2009). Depletion of Ly6G/Gr-1 leukocytes after spinal cord injury in mice alters wound healing and worsens neurological outcome. *Journal of Neuroscience*, 29(3), 753–764. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4918-08.2009>
- Tang, J., Guo, W. C., Hu, J. F., & Yu, L. (2019). Let-7 participates in the regulation of inflammatory response in spinal cord injury through PI3K/Akt signaling pathway.

- European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(16), 6767–6773.
https://doi.org/10.26355/eurev_201908_18714
- Tang, Y., Fu, R., Ling, Z.-M., Liu, L., Yu, G., Li, W., Fang, X., Zhu, Z., Wu, W., & Zhou, L.-H. (2018). MiR-137–3p rescue motoneuron death by targeting calpain-2. *Nitric Oxide*, 74, 74–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.01.008>
- Tao, B., & Shi, K. (2016). Decreased miR-195 expression protects rats from spinal cord injury primarily by targeting HIF-1 α . *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 46(1), 49–53.
- Tator, C. H. (1995). Update on the Pathophysiology and Pathology of Acute Spinal Cord Injury. *Brain Pathology*, 5(4), 407–413. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1995.tb00619.x>
- Theis, T., Yoo, M., Park, C. S., Chen, J., K  gler, S., Gibbs, K. M., & Schachner, M. (2017). Lentiviral Delivery of miR-133b Improves Functional Recovery After Spinal Cord Injury in Mice. *Molecular Neurobiology*, 54(6), 4659–4671. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0007-z>
- Tili, E., Michaille, J.-J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C. G., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b Levels following Lipopolysaccharide/TNF- α Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock. *The Journal of Immunology*, 179(8), 5082–5089. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5082>
- Visvanathan, J., Lee, S., Lee, B., Lee, J. W., & Lee, S.-K. (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes and Development*, 21(7), 744–749. <https://doi.org/10.1101/gad.1519107>
- Xu, Z., Zhang, K., Wang, Q., & Zheng, Y. (2019). MicroRNA-124 improves functional recovery and suppresses Bax-dependent apoptosis in rats following spinal cord injury. *Molecular Medicine Reports*, 19(4), 2551–2560. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9904>
- Yan, P., Wu, X., Liu, X., Cai, Y., Shao, C., & Zhu, G. (2019). A Causal Relationship in Spinal Cord Injury Rat Model Between Microglia Activation and EGFR/MAPK Detected by Overexpression of MicroRNA-325-3p. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 68(2), 181–190. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01297-w>
- Yang, L., Ge, D., Chen, X., Jiang, C., & Zheng, S. (2018). MiRNA-544a regulates the inflammation of spinal cord injury by inhibiting the expression of NEUROD4. *Cellular*

Physiology and Biochemistry, 51(4), 1921–1931. <https://doi.org/10.1159/000495717>

- Yang, R., Cai, X., Li, J., Liu, F., & Sun, T. (2019). Protective effects of miR-129-5p on acute spinal cord injury rats. *Medical Science Monitor*, 25, 8281–8288. <https://doi.org/10.12659/MSM.916731>
- You, C., Cui, J., Wang, H., Qi, X., Kuo, L. Y., Ma, H., Gao, L., Mo, B., & Chen, X. (2017). Conservation and divergence of small RNA pathways and microRNAs in land plants. *Genome Biology*, 18(158). <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1291-2>
- Yunta, M., Nieto-Díaz, M., Esteban, F. J., Caballero-López, M., Navarro-Ruiz, R., Reigada, D., Pita-Thomas, D. W., del Águila, A., Muñoz-Galdeano, T., & Maza, R. M. (2012). MicroRNA dysregulation in the spinal cord following traumatic injury. *PloS One*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034534>
- Zhang, M., Zheng, J., Nussinov, R., & Ma, B. (2017). Release of Cytochrome C from Bax Pores at the Mitochondrial Membrane. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02825-7>
- Zhang, T., Ni, S., Luo, Z., Lang, Y., Hu, J., & Lu, H. (2019). The protective effect of microRNA-21 in neurons after spinal cord injury. *Spinal Cord*, 57(2), 141–149. <https://doi.org/10.1038/s41393-018-0180-1>
- Zhang, W., Kim, P. J., Chen, Z., Lokman, H., Qiu, L., Zhang, K., Rozen, S. G., Tan, E. K., Je, H. S., & Zeng, L. (2016). MiRNA-128 regulates the proliferation and neurogenesis of neural precursors by targeting PCMI in the developing cortex. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.11324>
- Zhou, H.-J., Wang, L.-Q., Xu, Q.-S., Fan, Z.-X., Zhu, Y., Jiang, H., Zheng, X.-J., Ma, Y.-H., & Zhan, R.-Y. (2016). Downregulation of miR-199b promotes the acute spinal cord injury through IKK β -NF- κ B signaling pathway activating microglial cells. *Experimental Cell Research*, 349(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.09.020>
- Zhu, Y., Xu, Q., Sha, W. P., Zhao, K. P., & Wang, L. M. (2019). MiR-219-5p promotes spinal cord injury recovery by inhibiting NEUROD2-regulated inflammation and oxidative stress. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(1), 37–43. https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16745
- Zou, D., Chen, Y., Han, Y., Lv, C., & Tu, G. (2014). Overexpression of microRNA-124

promotes the neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Neural Regeneration Research*, 9(12), 1241–1248. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.135333>